

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**



Dynamic Search: Derwent World Patents Index

Records for: de 4013004

save as alert...

save strategy only...

Output

Format: Full Record

Output as: Browser

display / send

Modify

refine search

back to picklist

select
all none

Records 1 of 1 In full Format

☐ 1. 8/19/1

008822323 **Image available**

WPI Acc No: 1991-326336/ 199145

XRAM Acc No: C91-140984

XRPX Acc No: N91-249915

ELISA determ. of low mol. wt. pesticides, antibiotics or
toxins - using enzyme labelled antibody reactant, providing lower
detection limit

Patent Assignee: SCHECKLIES E (SCHE-I)

Inventor: SCHECKLIES E

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 4013004	A	19911031	DE 4013004	A	19900424	199145 B
DE 4013004	C2	19931021	DE 4013004	A	19900424	199342

Priority Applications (No Type Date): DE 4013004 A 19900424

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
DE 4013004	C2	21	G01N-033/535	

Abstract (Basic): DE 4013004 A

In the quantitative ELISA determ. of low mol. wt. organic
substances (I), the new feature is that an enzyme-coupled antibody
(Ab1) is used as the reaction partner.

Ab1 is coupled to alkaline phosphatase using glutardialdehyde as
coupling agent. It is directed against ochratoxin A, aflatoxins M1 or
B1; chloramphenicol; zearalenone; triazines; deoxynivalenol; dinitro
aromatic cpds.; ergot alkaloids; nitrosamines, penicillins; patulin;
phenylureas, or chlorinated anilines or phenols.

USE/ADVANTAGE - This method provides significantly better
detection limits (up to 100 times lower) than the conventional process
which uses labelled hapten. It is also quicker and less expensive,
since derivatisation steps are avoided. The method is esp. used to
monitor mycotoxins, antibodies and pesticides in food, water, etc..
Transportable, storage-stable assay kits can be prepd.. (21pp
Dwg.No.1/11)

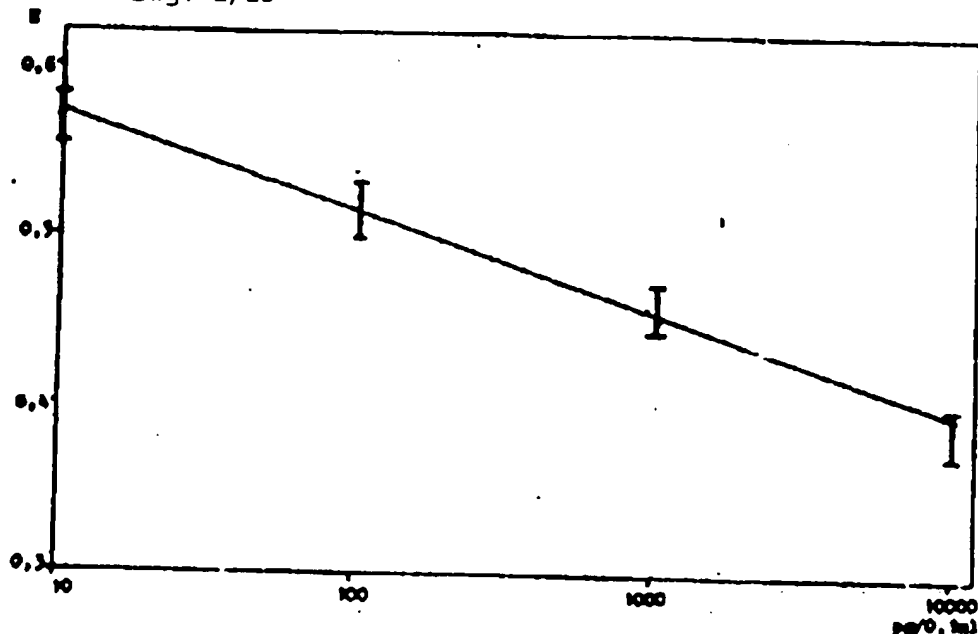
Abstract (Equivalent): DE 4013004 C

Determination of specific organic substances of low molecular mass
by an ELISA process comprises incubating a test sample with a corresp.
antibody-enzyme conjugate and an immobilised antibody on an inert solid
carrier, so that the two antibody components have equal binding
constants for the analyte; then measuring the enzyme activity of the
solid or soln. phase; and comparing results with those obtd. using
standard solns. of the analyte. The enzyme marker of the conjugate is
pref. alkaline phosphatase, linked to the antibody by coupling with
glutardialdehyde.

USE - Used for a wide range of organic analytes, e.g. toxins,
chloroamphenicol, zearalenone, penicillins, alkaloids, nitrosamines,

chlorinated phenols, triazines, etc.

Dwg. 1/13



Title Terms: DETERMINE; LOW; MOLECULAR; WEIGHT; PEST; ANTIBIOTIC; TOXIN;
 ENZYME; LABEL; ANTIBODY; REACT; LOWER; DETECT; LIMIT

Derwent Class: B04; C03; D15; D16; J04; S03

International Patent Class (Main): G01N-033/535

International Patent Class (Additional): C12Q-001/42; G01N-033/15;
 G01N-033/53

File Segment: CPI; EPI

Manual Codes (CPI/A-N): B02-C; B02-P; B04-A03; B04-B02B; B04-B02C3;
 B04-B04C; B06-A02; B06-A03; B07-D13; B10-A13D; B10-A18; B10-B04A; B10-D01
 ; B10-E02; B10-G03; B11-C07A4; B12-K04E; C02-C; C02-P; C04-A03; C04-B02B;
 C04-B02C3; C04-B04C; C06-A02; C06-A03; C07-D13; C10-A13D; C10-A18;
 C10-B04A; C10-D01; C10-E02; C10-G03; C11-C07A4; C12-K04E; D03-K03;
 D03-K04; D04-A01H; D05-A01A4; D05-A01B3; D05-H09; J04-B01B

Manual Codes (EPI/S-X): S03-E14A; S03-E14H4

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M781 M903 P831 V600 V611 V802 V813

Chemical Fragment Codes (M2):

02 G013 G100 H3 H341 H4 H402 H482 H6 H602 H608 H684 H8 J0 J011 J3 J371
 M280 M311 M313 M321 M332 M343 M344 M349 M362 M373 M391 M414 M510
 M520 M531 M540 M750 M903 M904 M910 N102 Q233 Q435 R00112-A

03 D013 D016 D019 E670 G010 G100 J0 J012 J1 J111 J3 J321 J5 J521 L9
 L941 M210 M211 M240 M282 M311 M321 M342 M372 M391 M412 M511 M520
 M531 M540 M750 M903 M904 M910 N102 Q233 Q435 V0 V161 R00222-A

04 D011 D021 D029 D030 D240 H401 H421 H541 H8 J5 J521 J561 L9 L942 M210
 M211 M272 M280 M281 M320 M412 M511 M520 M530 M540 M750 M903 M904
 N102 Q233 Q435 R08213-A R08215-A 13525

05 D014 D023 D130 H4 H402 H442 H8 J5 J522 L9 L942 M210 M211 M240 M281
 M320 M412 M511 M520 M530 M540 M750 M903 M904 N102 Q233 Q435 R14831-A
 13525 40640

06 D013 D024 D130 G010 G100 H4 H401 H441 H6 H602 H641 H8 J0 J012 J1
 J171 J3 J331 J5 J521 L9 L942 M210 M211 M240 M281 M312 M321 M332 M343
 M349 M371 M391 M412 M511 M520 M531 M540 M750 M903 M904 N102 Q233
 Q435 R08232-A 13525 40640 01732

07 D011 D012 D160 H4 H401 H421 H8 J5 J521 L9 L942 M280 M320 M412 M511
 M520 M530 M540 M750 M903 M904 N102 Q233 Q435 R08233-A 13525 40640
 01732 01315

08 D011 D021 D024 D030 D041 D220 F012 F022 F100 H4 H402 H462 H481 H8
 M210 M211 M240 M282 M311 M321 M342 M373 M391 M412 M511 M521 M530
 M540 M750 M903 M904 N102 Q233 Q435 R11861-A 13525 40640 01732 01315

00012 40466 40467

Chemical Fragment Codes (M6):

10 M903 P831 Q233 Q435 R160 R515 R520 R521 R614 R621 R624 R633 R636

R639 13525 40640 01732 01315 00012 40466 40467

Ring Index Numbers: ; 13525; 40640; 01732; 01315; 00012; 40466; 40467

Derwent Registry Numbers: 0112-U; 0222-U

Specific Compound Numbers: R00112-A; R00222-A; R08213-A; R08215-A; R14831-A
; R08232-A; R08233-A; R11861-A

Derwent WPI (Dialog® File 351): (c) 2002 Thomson Derwent. All rights reserved.

©1997-2002 The Dialog Corporation -



⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 40 13 004 A 1**

⑳ Aktenzeichen: P 40 13 004.5
㉑ Anmeldetag: 24. 4. 90
㉒ Offenlegungstag: 31. 10. 91

⑤① Int. Cl. 5:
G 01 N 33/535
G 01 N 33/15
C 12 Q 1/42
// C 07C 47/12, C 12Q
1/28, 1/34, C 07K 17/00

DE 40 13 004 A 1

⑦① Anmelder:
Schecklies, Elvira, 8061 Hebertshausen, DE

⑦② Erfinder:
gleich Anmelder

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Verfahren zur quantitativen enzymimmunologischen Bestimmung von niedermolekularen organischen Substanzen mittels ELISA-Methode unter Verwendung eines enzymgekoppelten Antikörpers

⑤⑦ Es wird ein Verfahren zur quantitativen enzymimmunologischen von niedermolekularen organischen Substanzen mittels der ELISA-Technik zur Verfügung gestellt, bei dem als Reaktionspartner ein enzymgekoppelter Antikörper verwendet wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren bietet durch den Einsatz eines Antikörper-Enzym-Konjugats anstelle des bisher verwendeten Hapten-Enzym-Konjugats die Möglichkeit, niedermolekulare organische Verbindungen - sofern gegen sie überhaupt Antikörper hergestellt werden können - mit deutlich verbesserten Nachweisgrenzen zu erfassen.

Die Herstellung eines ELISA-Test-kits auf dieser Basis wird durch das erfindungsgemäße Verfahren nicht nur beschleunigt, sondern auch preisgünstiger, da aufwendige Derivatisierungen entfallen.

DE 40 13 004 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur quantitativen Bestimmung von niedermolekularen organischen Substanzen mit der Technik des Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay (ELISA: Festphasenimmuntest).

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt die Bestimmung niedermolekularer Substanzen mit Nachweisgrenzen, die bis zu zwei Zehnerpotenzen unter denen liegen, die mit herkömmlichen Verfahren erreicht werden.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können praktisch alle niedermolekularen organischen Substanzen, für die Antikörper verfügbar sind, bestimmt werden.

Insbesondere eignet es sich zur Bestimmung von Mykotoxinen, Antibiotika und Pestiziden, bevorzugt von Ochratoxin A, Aflatoxin M1, Aflatoxin B1, Deoxynivalenol, Ergot-alkaloiden, Zearalenon, Patulin, Chloramphenicol, β -Lactamen (Penicillinen), Triazinen, Dinitroaromaten, Phenylharnstoffen, chlorierten Anilinen, chlorierten Phenolen und Nitrosaminen.

Das Prinzip des Enzymimmunoassays beruht auf einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion.

Unter Antigenen versteht man dabei körperfremde Substanzen, die, gelangen sie in einen Organismus, eine Immunreaktion auslösen. Diese besteht im Wesentlichen in der Produktion von Eiweißstoffen, die ganz spezifisch das entsprechende Antigen binden. Diese Eiweißstoffe bezeichnet man als Antikörper.

Handelt es sich bei dem Antigen um eine niedermolekulare organische Substanz, so spricht man von Haptene.

Da Haptene jedoch selbst nicht immunogen sind, muß man sie zur Herstellung der Antikörper an Trägerproteine binden.

Dabei muß die Kopplungsstelle so gewählt werden, daß die für die jeweilige Substanz charakteristische Struktur möglichst unverändert erhalten bleibt.

Mit so hergestellten Antikörpern werden sog. kompetitive ELISAs entwickelt. Darunter versteht man Testsysteme, bei denen der Antikörper an Trägermaterial, z. B. Mikrotiterplatten gebunden wird. In der anschließenden Reaktion konkurrieren freie Haptene (in Standard oder Probe) mit gekoppelten Haptenen (z. B. an alkalische Phosphatase, Peroxidase) um einen Unterschluß an Antikörper.

Die in dieser Reaktion gebundene Menge an gekoppelten Haptenen wird durch die Enzymaktivität gemessen.

Bei Enzymimmuntests gegen Haptene muß in jedem Fall der Antikörper an das Trägermaterial gebunden werden.

Bei den bisherigen Verfahren wird zum Nachweis des Haptens die Verbindung selbst an das Enzym (z. B. alkalische Phosphatase, Peroxidase, β -Galactosidase) chemisch gebunden. Das Enzym darf bei dieser Kopplung seine Aktivität nicht verlieren.

In der Regel steht für diese Kopplung aufgrund der geringen Größe des Haptens nur eine Bindungsstelle im Molekül zur Verfügung. Somit erfolgt die Kopplung an das Enzym über die selbe Struktureinheit im Hapten wie bei der Kopplung des Haptens an das Trägerprotein für die Immunisierung.

Bei der Durchführung des Tests werden die mit Antikörpern beschichteten Reaktionsgefäße (Küvetten, Kavitäten der Mikrotiterplatte) zunächst mit Probe und dann mit einer bestimmten Menge an Hapten-Enzym-Konjugat gefüllt.

In der darauf folgenden Reaktionszeit konkurrieren die Haptene in der Probe (also die zu bestimmenden Substanzen) mit den enzymgebundenen Haptenen um einen Unterschluß an Antikörpern.

Antikörper und Hapten-Enzym-Konjugat befinden sich dabei immer in gleichbleibend konstantem Konzentrationsverhältnis. Variabel ist jeweils nur die Konzentration des Haptens in der Probe.

Anhand von definierten Standards läßt sich der Gehalt in der Probe quantitativ bestimmen.

Die Herstellung eines spezifischen Antikörpers gegen Aflatoxin M1, mit dem ein heterologer Immunoassay zum Nachweis von Aflatoxin M1 in Milch und Milchpulver entwickelt wurde, ist aus "Archiv für Lebensmittelhygiene" 36, 49–76, 1985 bekannt. Als enzymmarkiertes Toxin diente dabei ein Aflatoxin B1-Meerrettichperoxidase-Konjugat.

In "Archiv für Lebensmittelhygiene" 38, 1–32, 1987 ist ein enzymimmunologischer Nachweis von Chloramphenicol in Milch beschrieben. Bei der Entwicklung dieses heterologen Enzymimmunoassays zum Nachweis von Chloramphenicol wurde peroxidasemarkiertes Chloramphenicol als Enzymkonjugat verwendet. Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens lag unter 500 ng/kg.

Aus "Journal of Food Protection" Bd. 49, Nr. 10, S. 792–795, Okt. 1986 ist ein ELISA zum Nachweis von Aflatoxin B1, in dem als Enzymkonjugat Aflatoxin B1-Peroxidase verwendet wird, bekannt.

Im Zuge der fortschreitenden Analytik auf allen Gebieten werden immer niedrigere Nachweisgrenzen für die analytischen Methoden gefordert.

Um den nötigen Sicherheitsspielraum für toxische Substanzen zu gewährleisten, werden Grenzwerte bewußt niedrig angesetzt. So liegen z. B. laut Trinkwasserverordnung vom 1.10.1989 die Grenzwerte für Pestizide bei 100 ng/l. Der Grenzwert für Aflatoxine in Milch bei Babynahrung soll laut Bundesgesundheitsamt sogar bei 10 pg/ml liegen.

Bei den nach dem Stand der Technik bekannten Verfahren werden jedoch meist nur Nachweisgrenzen erreicht, die im Bereich des gesetzlichen Grenzwerts oder sogar darüber liegen.

Die Entscheidung, ob ein Nahrungsmittel noch den Vorschriften entspricht, ist mitunter schwer zu treffen.

Die oft nicht ausreichende Empfindlichkeit der Tests hat ihren Grund in der Konkurrenz mit enzymgekoppeltem Hapten: Wird ein Tier mit einem Hapten-Protein-Konjugat immunisiert, so bildet der Organismus die Antikörper nicht gegen das ganze Molekül, sondern nur gegen Teilstrukturen, z. B. funktionelle Gruppen.

Man erhält also eine Vielzahl von Antikörpern, die gegen unterschiedliche Bereiche des Konjugats gerichtet sind. Darunter befinden sich Antikörper, die gegen die gewünschten Strukturen des Haptens gerichtet sind, Antikörper, die gegen Teilsequenzen des Trägerproteins gerichtet sind und Antikörper, die gegen die Verbindungsstelle zwischen Hapten und Trägerprotein gerichtet sind.

Alle diese Antikörper werden (bei der Verwendung polyklonaler Seren) an die Mikrotiterplatten oder Küvetten fixiert und können somit ihr entsprechendes Antigen binden.

Die Antikörper gegen das Trägerprotein beeinträchtigen den Test nicht, da die Trägerproteine sich in ihrer Struktur von den Proteinstrukturen des verwendeten Enzyms stark unterscheiden.

Problematisch sind die Antikörper, die gegen die Verbindung zwischen Hapten und Protein gerichtet sind.

So wird durch die fixierten Antikörper nicht nur freies oder enzymgebundenes Hapten erkannt, sondern auch die Bindungsstelle zwischen Hapten und Enzym, da normalerweise nur eine günstige Kopplungsstelle im Hapten zur Verfügung steht, und somit die Verbindungsstellen zwischen Hapten und Trägerprotein und Hapten und Enzym identisch sind. Das enzymgekoppelte Hapten besitzt so eine höhere Affinität zum Antikörperpool als freies Hapten in der Probe (Brückeneffekt).

Daraus ergibt sich, daß die zu bestimmende Verbindung (in Standard oder Probe) in höherer Konzentration vorhanden sein muß, um das Hapten-Enzym-Konjugat vom Antikörper zu verdrängen.

Dies verringert die Empfindlichkeit des Tests.

Der Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, die durch den Brückeneffekt bedingte Unempfindlichkeit der enzymimmunologischen Bestimmungen von Haptenelementen mittels der ELISA-Technik zu minimieren und das Verfahren zugleich kostengünstiger und schneller zu gestalten.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß man statt eines Hapten-Enzym-Konjugats ein Antikörper-Enzym-Konjugat als Reaktionspartner verwendet.

Es wurde gefunden, daß die Teile des Antikörpers, die das Hapten erkennen (Fab-Teile), zueinander eine Affinität besitzen, die in der Größenordnung der Affinität von Antikörpern zu Haptenen liegt.

Die entsprechenden Affinitätskonstanten wurden durch Bildung von Antikörper-Antikörper-Komplexen bei steigenden Mengen an enzymgekoppeltem Antikörper und konstanten Konzentrationen an fixiertem Antikörper ermittelt.

Zum Vergleich wurden die Affinitätskonstanten der Antikörper zu den Haptenen selbst dadurch ermittelt, daß die Bildung von Hapten-Antikörper-Komplexen bei steigenden Mengen an enzymmarkiertem Hapten und konstanter Konzentration an fixiertem Antikörper ermittelt wurde.

Die jeweiligen Affinitätskonstanten sind in folgender Tabelle für einige Tests beispielhaft aufgezeigt.

Test	Konstante f. Antikörper	Konstante f. Hapten
Triazin	0,91/mol	1,21/mol
Chloramphenicol	2,11/mol	1,81/mol
Ochratoxin A	0,61/mol	0,81/mol
Dinitroaromaten	2,11/mol	1,91/mol

Daher läßt sich die Empfindlichkeit des Verfahrens deutlich erhöhen (Wegfall des Brückeneffekts), wenn man zum quantitativen Nachweis ein Antikörper-Enzym-Konjugat anstelle des bisher verwendeten Hapten-Enzym-Konjugats einsetzt.

Bei der Testdurchführung werden die Mikrotiterplatten nach an sich bekannten Methoden mit Antikörpern gegen die zu bestimmende Substanz beschichtet und anschließend abgeblockt (Maskieren unspezifischer Bindungsstellen). In den Testansatz pipettiert man Standards und Proben, die die zu bestimmende Verbindung enthalten.

Erfindungsgemäß gibt man statt eines Hapten-Enzym-Konjugats ein Antikörper-Enzym-Konjugat zu.

In einer anschließenden Inkubationszeit konkurrieren enzymgekoppelte Antikörper und die zu bestimmende

Verbindung um die Bindungsstellen des an die Mikrotiterplatten fixierten Antikörpers, der sich im Unterschub befindet. Nach Auswaschen nicht gebundener Reaktanden kann durch Substratzugabe die Menge des gebundenen Antikörper-Enzym-Konjugats ermittelt werden.

Das gekoppelte Enzym bildet aus dem Substrat einen Farbstoff, der photometrisch gemessen werden kann. Dabei ist die Farbintensität umgekehrt proportional zur Konzentration des Haptens in der Probe.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird durch die im Folgenden aufgeführten Beispiele näher erläutert. Diese dienen jedoch nicht dazu, den Umfang der Erfindung zu beschränken.

Als Plattenmaterial wurden handelsübliche Mikrotiterplatten verwendet.

Als alkalische Phosphatase wurde ein im Handel übliches Produkt eingesetzt.

Sämtliche verwendeten Reagenzien sollen dem Reinheitsgrad p. a. entsprechen.

Das Wasser zur Herstellung der Puffer, sowie zum Waschen der Mikrotiterplatten sollte höchsten Reinheitsgraden entsprechen.

Die Antikörper wurden nach an sich bekannten Verfahren zur Herstellung von Antikörpern gegen Haptene gewonnen. So sind derartige Verfahren z. B. aus "Immunoassays in Food Analysis", Elsevier Verlag, 1985, 159-167 bekannt. Die Kopplungsreaktionen der einzelnen Antikörper an das verwendete Enzym (alkalische Phosphatase) wurden nach allgemein bekannten Methoden durchgeführt - als Kopplungsreagenz wurde Glutardialdehyd eingesetzt (Practice and Theory of Enzymeimmunoassays, Elsevier Verlag, Burdon, 1985, 242-245).

Zur Aufarbeitung der Proben, die mit dem ELISA untersucht werden sollen, eignet sich im Prinzip jede Methode, die gewährleistet, daß sich die zu bestimmende Substanz am Ende der Probenaufarbeitung in wäßriger Phase befindet. Der Anteil an organischen Lösungsmitteln soll 5% nicht überschreiten.

Die im Folgenden aufgeführten Probenaufarbeitungen lassen sich für alle festen Materialien wie z. B. Getreide und -produkte (Brot, Futtermittel, Nudeln etc.), Nüsse, Ei und -produkte u. a. m. anwenden.

Bei der Extraktion von Ochratoxin A werden 2 g fein gemahlene Probe mit 5 ml Chloroform und 0,1 ml 1n-HCl 15 Minuten gerührt. Anschließend werden die Festbestandteile abzentrifugiert und die organische Phase mit einem Aliquot an 0,15 m Bicarbonatlösung pH 8,5 extrahiert. Zur Phasentrennung wird erneut abzentrifugiert und die wäßrige Phase im Test eingesetzt.

Zur Extraktion von Chloramphenicol, Aflatoxin M1, Aflatoxin B1, Ergot-alkaloiden und Patulin werden 2 g zerkleinerte Probe mit 5 ml 55%igem Methanol und 2 ml Hexan (bei hohem Fettgehalt, z. B. Butter, Nüsse, Trockeneigelb etc. 4 ml Hexan) 15 Minuten gerührt. Bei der Extraktion von Zearalenon und Deoxynivalenol verlängert sich diese Rührzeit auf 10 Stunden.

Anschließend zentrifugiert man ab, die Wasser-Methanol-Phase kann direkt mindestens 1 : 10 verdünnt im Test eingesetzt werden.

Die verwendeten Extrakte müssen völlig frei von Schwebeteilchen sein. Ist dies bei manchen Proben allein durch Zentrifugation nicht zu erreichen, wird eine Membranfiltration des Extrakts angeschlossen.

Will man die Pestizide (Triazine, Dinitroaromaten, Phenylharnstoffe, chlorierte Aniline, chlorierte Phenole) in festem Probenmaterial (z. B. Gemüse) nachweisen, kann die selbe Probenaufarbeitung wie bei den Mykoto-

xinen verwendet werden. Dabei ist jedoch der eigene Wassergehalt (z. B. Gurken 90%) zu berücksichtigen. Es muß prozentual mehr Methanol eingesetzt werden, um eine Endkonzentration von 55% im Extrakt zu erreichen.

Für Trinkwasser (Pestizide), Milch (Aflatoxin M1), Bier (Pestizide, Mykotoxine) und andere flüssige Proben (außer Serum) ist keine Probenaufarbeitung notwendig.

Die Proben können selbst unverdünnt im Test eingesetzt werden.

Bei der Probenextraktion werden eine Reihe anderer Inhaltsstoffe mitisoliert, so z. B. Salze, Farbstoffe, evtl. Proteine, Aminosäuren, Zucker u. a. m.

Da es sich bei Antikörpern um Eiweißstoffe handelt, kann deren Ladung und Struktur vom umgebenden Medium beeinflusst werden (pH-Wert, Ionenstärke, Proteinkonzentration, Lösungsmittelreste etc.).

Pipettiert man nun den Extrakt in den Test, so setzt man sowohl den fixierten Antikörper als auch den enzymgekoppelten Antikörper diesen Einflüssen des Extrakts aus. Dadurch werden bei der Messung später andere Extinktionswerte erzielt als bei Einsatz von destilliertem Wasser. Diese Beobachtung wird als Matrixeffekt bezeichnet. Um durch diesen Matrixeffekt bedingte falsch positive oder falsch negative Ergebnisse zu vermeiden, werden bei dem erfindungsgemäßen Verfahren die Standards jeweils in einem Nullextrakt des selben Probenmaterials angesetzt, z. B. werden bei der Untersuchung von Weizenproben die Standards in einem toxin- oder pestizidfreiem Weizenextrakt angesetzt.

Die Verdünnung dieses Nullextrakts ist dabei dieselbe wie die Verdünnung der Probenextrakte.

Dadurch herrschen sowohl in den Kavitäten der Standards als auch bei den Proben die gleichen Reaktionsbedingungen. Die Ergebnisse können unter Berücksichtigung der Wiederfindungsrate direkt ohne Verwendung von Umrechnungsfaktoren ausgewertet werden.

Beispiel 1

Bestimmung von Ochratoxin A

Für die Kopplung von Antikörpern gegen Ochratoxin A an alkalische Phosphatase werden 0,5 mg Antikörper in 1 ml phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS) mit 300 U alkalischer Phosphatase und 0,05 ml 25%igem Glutardialdehyd 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubationszeit gibt man 0,1 ml 1 m Lysin (in Wasser) dazu und reinigt dann das Kopplungsprodukt durch dreitägige Dialyse gegen PBS bei 4 Grad C. Die Standardkonzentrationen, die im Test eingesetzt werden, liegen zwischen 10 pg/0,1 ml und 10 ng/0,1 ml.

Bei der Testdurchführung pipettiert man in die mit Antikörper beschichteten Kavitäten (die dabei zu verwendende Konzentration ist abhängig von Kopplungsrate des Antikörper-Enzym-Konjugats und vom Plattenmaterial selbst – die optimalen Konzentrationsverhältnisse müssen jeweils ausgetestet werden) zunächst 0,1 ml Standard oder Probe. Darauf gibt man 0,1 ml Antikörper-Enzymkonjugat in der optimierten Verdünnung.

In einer anschließenden einstündigen Inkubationszeit werden die Bindungsstellen der Antikörper besetzt.

Die Platte wird dann 3 x mit dest. Wasser gewaschen. Danach gibt man in jede Kavität 0,2 ml der Substratlösung. Sie besteht aus 1 mg p-Nitrophenylphosphat/ml 10%igem Diethanolaminpuffer pH 9,6.

Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei 37 Grad C im Dunkeln kann die Platte bei 410 nm gemessen werden. Aufgrund des Matrixeinflusses kann sich diese Inkubationszeit verschieben. Gemessen wird, wenn die Extinktion des niedrigsten Standards zwischen 0,5 und 0,9 liegt. Verlauf der Standardkurve: s. Fig. 1.

Beispiel 2

Bestimmung von Aflatoxin M1

Für die Kopplung von Antikörpern gegen Aflatoxin M1 an alkalische Phosphatase werden 0,5 mg Antikörper in 1 ml PBS mit 350 U alkalischer Phosphatase und 0,01 ml 25%igem Glutardialdehyd 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dieser Zeit gibt man zum Abstoppen der Reaktion 0,1 ml 1 m L-Lysin zu. Anschließend wird das Kopplungsprodukt drei Tage bei 4 Grad C durch Dialyse gegen PBS gereinigt.

Die im Test verwendeten Standardkonzentrationen liegen zwischen 0,1 pg/0,1 ml und 100 pg/0,1 ml.

Bei der Testdurchführung pipettiert man nacheinander 0,1 ml Standard oder Probe und 0,1 ml Antikörper-Enzym-Konjugat pro Kavität. Die Konzentrationsverhältnisse zwischen fixiertem Antikörper und Antikörper-Enzym-Konjugat müssen optimiert werden (neue Synthese, anderes Plattenmaterial).

Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei 4 Grad C wäscht man die Platte dreimal mit dest. Wasser und gibt dann die Substratlösung zu (s. Beispiel 1). Anschließend wird 2 Stunden bei 37 Grad C im Dunkeln inkubiert und dann bei 410 nm gemessen.

Auch hier sollte die Extinktion des niedrigsten Standards zwischen 0,5 und 0,9 liegen.

Verlauf der Standardkurve: s. Fig. 2.

Beispiel 3

Bestimmung von Aflatoxin B1

Um die Antikörper gegen Aflatoxin B1 an alkalische Phosphatase zu koppeln, inkubiert man 0,5 mg Antikörper in 1 ml PBS mit 300 U alkalischer Phosphatase und 0,1 ml 25%igem Glutardialdehyd für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von 0,1 ml 1 m L-Lysin-Lösung abgestoppt und das Kopplungsprodukt durch eine dreitägige Dialyse gegen PBS bei 4 Grad C gereinigt.

Als Standards wurden im Test Konzentrationen zwischen 0,1 pg/0,1 ml und 100 pg/0,1 ml eingesetzt.

Bei der Testdurchführung werden nacheinander zunächst 0,1 ml Standard oder Probe, dann 0,1 ml Antikörper-Enzym-Konjugat pipettiert. Die optimalen Konzentrationen sind auch hier von der jeweiligen Synthese und vom verwendeten Plattenmaterial abhängig.

Der Testansatz inkubiert 1 Stunde bei 4 Grad C. Anschließend wird gewaschen (dreimal mit dest. Wasser) und die Substratlösung zugegeben (s. Beispiel 1). Nach einer weiteren Stunde Inkubationszeit bei 37 Grad C im Dunkeln wird die Platte bei 410 nm gemessen. Der Matrixeinfluß kann auch hier eine Verlangsamung oder Beschleunigung der Extinktionswerte bewirken.

Die Werte des niedrigsten Standards sollten bei der Messung zwischen 0,5 und 0,9 liegen.

Verlauf der Standardkurve: s. Fig. 3.

Beispiel 4

Bestimmung von Chloramphenicol

Zur Kopplung der Antikörper gegen Chloramphenicol an alkalische Phosphatase werden 0,5 mg Antikörper in 1 ml PBS mit 300 U alkalischer Phosphatase und 0,1 ml 25%igem Glutardialdehyd für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Abstoppen der Kopplungsreaktion gibt man anschließend 0,1 ml 1 m L-Lysin-

lösung dazu. Das Syntheseprodukt wird im Folgenden durch eine dreitägige Dialyse gegen PBS bei 4 Grad C gereinigt. Bei der Testdurchführung werden Standardkonzentrationen zwischen 0,1 pg/0,1 ml und 100 pg/0,1 ml eingesetzt. Zunächst gibt man nacheinander 0,1 ml Standard oder Probe und 0,1 ml Antikörper-Enzym-Konjugat in jede Kavität. Die optimale Verdünnung des Konjugats muß für jedes Plattenmaterial abgestimmt werden (unterschiedliche Bindungskapazitäten für den fixierten Antikörper etc.). Nach einer einstündigen Inkubation im Kühlschrank (4 Grad C) wird die Mikrotiterplatte dreimal mit dest. Wasser gewaschen.

Anschließend wird die Substratlösung zugegeben (s. Beispiel 1).

Nach einer weiteren Inkubationszeit von in der Regel einer Stunde bei 37 Grad C kann bei 410 nm gemessen werden. Die Extinktion des niedrigsten Standards soll dabei zwischen 0,5 und 0,9 liegen (Matrixeffekt).

Verlauf der Standardkurve: s. Fig. 4.

Beispiel 5

Bestimmung von Zearalenon

Um die Antikörper gegen Zearalenon an alkalische Phosphatase zu koppeln werden 0,5 mg Antikörper mit 300 U alkalischer Phosphatase und 0,05 ml 25%igem Glutardialdehyd in 1 ml PBS eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit wird die Reaktion durch Zugabe von 0,1 ml 1 m L-Lysin abgestoppt. Die Reinigung des Kopplungsprodukts erfolgt durch dreitägige Dialyse gegen PBS bei 4 Grad C. Als Standards werden Konzentrationen des Haptens von 0,1 pg/0,1 ml bis 100 pg/0,1 ml eingesetzt.

Bei der Testdurchführung werden zunächst 0,1 ml Standard oder Probe (Doppelbestimmung) und dann 0,1 ml des Antikörper-Enzym-Konjugats pro Kavität pipettiert.

Die Konzentration des Konjugats ist im Hinblick auf die Kopplungsrate (Verhältnis Antikörper zu Enzym) und die Bindungskapazität der Platte zu optimieren. Anschließend wird eine Stunde bei 4 Grad C inkubiert. Danach wäscht man die Mikrotiterplatte dreimal mit dest. Wasser. Nach Substratzugabe (s. Beispiel 1) und einer Stunde Inkubation bei 37 Grad C im Dunkeln kann die Platte zur Auswertung bei 410 nm gemessen werden. Aufgrund des Matrixeffekts kann sich die Dauer der Inkubationszeit nach oben oder unten verschieben.

Die Extinktionen des niedrigsten Standards sollten bei der Messung zwischen 0,5 und 0,9 liegen.

Verlauf der Standardkurve: s. Fig. 5.

Beispiel 6

Bestimmung von Triazinen

Zur Kopplung der Antikörper gegen Triazine an al-

kalische Phosphatase werden 0,5 mg Antikörper in 1 ml PBS mit 350 U alkalischer Phosphatase und 0,05 ml 25%igem Glutardialdehyd eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach stoppt man die Kopplungsreaktion durch Zugabe von 0,1 ml 1 m L-Lysin ab.

Die Reinigung des Konjugats erfolgt durch dreitägige Dialyse gegen PBS bei 4 Grad C.

Die Antikörper sind gegen die Gruppe der Triazine gerichtet. Als häufigsten und wichtigsten Vertreter dieser Gruppe wird in den Standardlösungen Atrazin eingesetzt. Die Konzentrationen liegen dabei zwischen 0,1 pg/0,1 ml und 100 pg/0,1 ml.

Bei der Testdurchführung werden zunächst 0,1 ml Standard oder Probe (Doppelbestimmung) und dann 0,1 ml Antikörper-Enzym-Konjugat pro Kavität pipettiert. Die Verdünnung des Konjugats muß in Hinblick auf Kopplungsrate und Bindungskapazität der Platte optimiert werden.

Die Inkubationszeit beträgt eine Stunde bei 4 Grad C. Anschließend wird die Mikrotiterplatte dreimal mit dest. Wasser gewaschen.

Dann wird die Substratlösung zugegeben (s. Beispiel 1). Nach einer weiteren Inkubationszeit von einer Stunde bei 37 Grad C im Dunkeln wird die Platte bei 410 nm gemessen.

Das Ergebnis wird bei der Auswertung in Atrazin-Einheiten angegeben.

Verlauf der Standardkurve: s. Fig. 6.

Beispiel 7

Bestimmung von Deoxynivalenol

Um Antikörper gegen Deoxynivalenol an alkalische Phosphatase zu koppeln, inkubiert man 0,5 mg Antikörper in 1 ml PBS mit 300 U alkalischer Phosphatase und 0,05 ml 25%igem Glutardialdehyd für 90 Minuten bei Raumtemperatur.

Die Reaktion wird dann durch Zugabe von 0,1 ml 1 m L-Lysin beendet. Die Reinigung des Produkts erfolgt durch dreitägige Dialyse gegen PBS bei 4 Grad C.

Bei der Testdurchführung werden Standardkonzentrationen im Bereich von 0,1 pg/0,1 ml bis 100 pg/0,1 ml eingesetzt. Zunächst werden 0,1 ml Standard oder Probe, dann 0,1 ml Antikörper-Enzym-Konjugat pro Kavität pipettiert. Die optimale Konjugatkonzentration muß für jede neue Synthese, bzw. für ein bestimmtes Plattenmaterial ermittelt werden.

Der Testansatz inkubiert eine Stunde bei 4 Grad C. Danach wird die Mikrotiterplatte dreimal mit dest. Wasser gewaschen. Anschließend wird die Substratlösung zugegeben (s. Beispiel 1).

Die Platte inkubiert nun 90 Minuten bei 37 Grad C im Dunkeln. Nach dieser Zeit wird der Test bei 410 nm gemessen.

Durch Matrixeffekte kann es zu einer Verkürzung oder Verlängerung dieser Inkubationszeit kommen – bei der Messung soll die Extinktion des niedrigsten Standards zwischen 0,5 und 0,9 liegen.

Verlauf der Standardkurve: s. Fig. 7.

Beispiel 8

Bestimmung von Ergot-alkaloiden

Zur Kopplung der Antikörper gegen Ergot-alkaloide werden 0,5 mg Antikörper mit 300 U alkalischer Phosphatase und 0,05 ml 25%igem Glutardialdehyd in

1 ml PBS für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von 0,1 ml 1 m L-Lysin-Lösung gestoppt. Die Reinigung des Konjugats erfolgt durch dreitägige Dialyse gegen PBS bei 4 Grad C.

Die im Test eingesetzten Standardkonzentrationen liegen zwischen 0,1 pg/0,1 ml und 100 pg/0,1 ml.

Welcher Vertreter aus der Gruppe der Ergot-alkaloide als Standard gewählt wird, hat untergeordnete Bedeutung, da die Erkennungsrate des Antikörpers in jedem Fall über 90% liegt.

Bei der Testdurchführung werden nacheinander 0,1 ml Standard oder Probe und 0,1 ml Antikörper-Enzym-Konjugat pro Kavität pipettiert. Die am besten geeignete Verdünnung des Konjugats muß ermittelt werden (abhängig von Kopplungsrate bei der Synthese und Plattenmaterial).

Die anschließende Inkubationszeit beträgt eine Stunde bei 4 Grad C.

Danach wäscht man die Platte dreimal mit dest. Wasser und gibt anschließend die Substratlösung zu (s. Beispiel 1). Nach einer weiteren Inkubationszeit von 90 Minuten bei 37 Grad C im Dunkeln wird die Platte bei 410 nm gemessen. Durch Matrixeffekte kann sich diese Inkubationszeit nach oben oder unten verschieben. Bei der Messung soll jedoch die Extinktion des niedrigsten Standards zwischen 0,5 und 0,9 liegen.

Verlauf der Standardkurve: s. Fig. 8.

Beispiel 9

Bestimmung von Nitrosaminen

Um die Antikörper gegen Nitrosamine an alkalische Phosphatase zu koppeln, werden 0,5 mg Antikörper in 1 ml PBS mit 300 U alkalischer Phosphatase und 0,1 ml 25%igem Glutardialdehyd für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach stoppt man die Reaktion durch Zugabe von 0,1 ml 1 m L-Lysin ab und reinigt das Syntheseprodukt durch eine dreitägige Dialyse gegen PBS bei 4 Grad C.

Als Standard wurde im Test Nitrosodiethanolamin eingesetzt. Die Erkennungsraten der verschiedenen Nitrosamine liegen zwischen 70 und 100%.

Als Standards wurden Konzentrationen zwischen 0,1 pg/0,1 ml und 100 pg/0,1 ml eingesetzt.

Bei der Testdurchführung werden 0,1 ml Standard oder Probe (Doppelbestimmung) und 0,1 ml Antikörper-Enzym-Konjugat (in 0,5% Ovalbumin Grade V) pro Kavität pipettiert. Die optimalen Konzentrationen (Verhältnis fixierter Antikörper-enzymgebundener Antikörper) muß vorher ermittelt werden. Die anschließende Inkubationszeit beträgt 45 Minuten bei 4 Grad C. Dann wird die Platte dreimal mit dest. Wasser gewaschen.

Nach Zugabe der Substratlösung (s. Beispiel 1) inkubiert man 120 Minuten bei 37 Grad C im Dunkeln.

Danach wird die Platte bei 410 nm gemessen.

Durch Matrixeffekte kann sich diese Inkubationszeit ändern. Die Platte muß in jedem Fall gemessen werden, wenn die Extinktion des niedrigsten Standards zwischen 0,5 und 0,9 liegt.

Verlauf der Standardkurve: s. Fig. 9.

Beispiel 10

Bestimmung von Dinitroaromaten

Für die Kopplung von Antikörpern gegen Dinitroaromaten an alkalische Phosphatase werden 0,5 mg Antikörper in 1 ml PBS mit 300 U alkalischer Phosphatase und 0,1 ml 25%igem Glutardialdehyd für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wird dann durch Zugabe von 0,1 ml 1 m L-Lysin abgestoppt. Die Reinigung des Konjugats erfolgt durch dreitägige Dialyse gegen PBS bei 4 Grad C. Als Standard wurde im Test Dinitrophenol eingesetzt. Die Erkennungsraten des Antikörpers liegen bei den einzelnen Dinitroaromaten zwischen 70 und 100%.

Die eingesetzten Standardkonzentrationen liegen zwischen 0,1 pg/0,1 ml und 100 pg/0,1 ml.

Zunächst werden beim Testablauf 0,1 ml Standard oder Probe und 0,1 ml Antikörper-Enzym-Konjugat pro Kavität pipettiert. Die optimalen Konzentrationen von fixiertem Antikörper und enzymgekoppeltem Antikörper müssen wiederum ermittelt werden.

Die anschließende Inkubationszeit beträgt eine Stunde bei 4 Grad C. Dann wird die Platte dreimal mit dest. Wasser gewaschen und die Substratlösung zugegeben (s. Beispiel 1). Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei 37 Grad C im Dunkeln kann die Platte bei 410 nm gemessen werden. Die ermittelten Ergebnisse verstehen sich als Dinitroaromat-Äquivalente.

Verlauf der Standardkurve: s. Fig. 10.

Beispiel 11

Bestimmung von Patulin

Zur Kopplung von Antikörpern gegen Patulin an alkalische Phosphatase werden 0,5 mg Antikörper in 1 ml PBS mit 300 U alkalischer Phosphatase und 0,05 ml 25%igem Glutardialdehyd eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach stoppt man die Reaktion durch Zugabe von 0,1 ml 1 m L-Lysin-Lösung ab. Die Reinigung des Konjugats erfolgt durch dreitägige Dialyse gegen PBS bei 4 Grad C.

Die im Test eingesetzten Standardkonzentrationen liegen zwischen 0,1 pg/0,1 ml und 100 pg/0,1 ml.

Bei der Testdurchführung werden zunächst 0,1 ml Standard oder Probe, dann 0,1 ml Antikörper-Enzym-Konjugat pipettiert. Die optimalen Konzentrationsverhältnisse werden wie bei den anderen Tests zunächst ermittelt. Die Inkubationszeit des Testansatzes beträgt eine Stunde bei 4 Grad C. Danach wird die Platte dreimal mit dest. Wasser gewaschen und die Substratlösung zugegeben (s. Beispiel 1).

Nach einer weiteren Inkubationszeit von einer Stunde bei 37 Grad C wird die Platte bei 410 nm gemessen. Aufgrund des Matrixeffekts kann sich die Inkubationszeit verkürzen oder verlängern.

Die Platte ist auf jeden Fall dann zu messen, wenn die Extinktion des niedrigsten Standards zwischen 0,5 und 0,9 liegt.

Verlauf der Standardkurve: s. Fig. 11.

Beispiel 12

Bestimmung von β -Lactamen (Penicillinen)

Um die Antikörper gegen β -Lactame an alkalische Phosphatase zu koppeln, inkubiert man 0,5 mg Antikörper in 1 ml PBS mit 300 U alkalischer Phosphatase und 0,05 ml 25%igem Glutardialdehyd für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Reaktion wird anschließend durch Zugabe von 0,1 ml 1 m L-Lysin abgestoppt.

Die Reinigung des Syntheseprodukts erfolgt durch dreitägige Dialyse gegen PBS bei 4 Grad C.

Bei der Testdurchführung werden Standardkonzentrationen von 1 pg/0,1 ml bis 1 ng/0,1 ml eingesetzt.

Die Erkennungsraten des Antikörpers bei den einzelnen Penicillinen liegt zwischen 90 und 100%.

Bei der Durchführung des Tests pipettiert man zunächst 0,1 ml Standard oder Probe, dann 0,1 ml Antikörper-Enzym-Konjugat pro Kavität.

Die optimalen Verhältnisse der Reaktanden werden vorher ermittelt.

Der Testansatz inkubiert anschließend eine Stunde bei 4 Grad C. Danach wäscht man die Platte dreimal mit dest. Wasser und gibt die Substratlösung zu (s. Beispiel 1). Nach einer zweiten Inkubationszeit von 45 Minuten bei 37 Grad C im Dunkeln kann der Test bei 410 nm gemessen werden.

Aufgrund eventueller Matrixeffekte kann diese Inkubationszeit differieren. Bei der Messung sollen die Extinktionswerte des niedrigsten Standards jeoch zwischen 0,5 und 0,9 liegen.

Verlauf der Standardkurve: s. Fig. 12.

Die ELISA-Technik ist in der Lebensmittelanalytik noch ein neues Feld. So gibt es bereits eine Reihe von Tests, die im Labormaßstab durchgeführt werden, aber nur wenige Firmen, die derartige Test-kits kommerziell vertreiben. Einige dieser Tests sind nur als semiquantitativ anzusehen.

Um die verbesserte Nachweisgrenze des erfindungsgemäßen Verfahrens beispielhaft aufzuzeigen, sei dem erfindungsgemäßen Test ein Kit der Firma Pfeiffer zum quantitativen Nachweis von Triazinen gegenübergestellt.

Bei der Durchführung dieses Tests pipettiert man zuerst 0,1 ml Standard oder Probe. Anschließend gibt man 0,05 ml Enzymtracer (Hapten-Enzym-Konjugat) zu. Die Mikrotiterplatte wird durchmischt und dann 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Die glatte wird dann dreimal mit einer Waschlösung gewaschen. Anschließend gibt man eine Substratlösung zu. Nach 2–4 Stunden Inkubationszeit wird bei 405 nm gemessen. Die sichere Nachweisgrenze dieses Tests (linearer Bereich) lag im Versuch bei 0,1 ppb, das entspricht dem gesetzlichen Grenzwert.

Von der Firma Transia wird ein enzymimmunologischer Test zum Nachweis von Chloramphenicol vertrieben. Dieser Test wird jedoch nicht auf einer Mikrotiterplatte, sondern auf einer Karte durchgeführt, und ist nur als semiquantitativ anzusehen. Die Nachweisgrenzen liegen je nach Probenart zwischen 5 und 20 ppb. Der im Bundesgesetzblatt (1988, S. 303) festgesetzte Grenzwert für Chloramphenicol liegt bei 1 ppb!

Der Vergleich der Standardkurven von Triazin mit dem erfindungsgemäßen Verfahren und dem Test der Firma Pfeiffer sei im Folgenden graphisch dargestellt: s. Fig. 13.

Das erfindungsgemäße Verfahren bietet einige wesentliche wirtschaftliche Vorteile.

Die Synthese der Antikörper-Enzym-Konjugate kann in einem, einfachen Reaktionsschritt durchgeführt werden. Aufwendigere und oft auch kostspielige Derivatisierungen, die zum Koppeln des Haptens an das Enzym notwendig sind, entfallen. Antikörper sind in der Regel in ausreichender, gleichbleibender Menge und Qualität vorhanden. Aus einem Kaninchen können innerhalb sechs Monaten so viele Antikörper isoliert werden, daß damit 500 000 Tests durchgeführt werden können.

Diese Antikörper sind, bei –20 Grad C gelagert,

praktisch unbegrenzt haltbar.

Derselbe Antikörper, mit dem die Mikrotiterplatten beschichtet werden, wird zur Herstellung des Antikörper-Enzym-Konjugats eingesetzt. Dadurch ist ein Reak-
5 stand der Kopplungsreaktion ohne zusätzlichen Aufwand und Kosten immer verfügbar. Die alkalische Phosphatase ist jederzeit in größeren Mengen erhältlich.

Das Antikörper-Enzymkonjugat ist somit mit geringem Aufwand auch in großen Mengen herstellbar.

Diese effiziente Herstellung ermöglicht es, dem Abnehmer eine kostengünstige analytische Methode zur Verfügung zu stellen.

Die verbesserten Nachweisgrenzen des erfindungsgemäßen Verfahrens erlauben den Einsatz in Lebensmittelkontrolle und Qualitätskontrolle der Lebensmittelhersteller (die Nachweisgrenzen liegen erheblich unter den festgesetzten Grenzwerten).

Dadurch werden die Kosten für lebensmittelchemische Untersuchungen deutlich gesenkt.

Die einfache Probenaufarbeitung, die zum Teil sogar entfällt, gibt auch kleinen Labors, die bisher aufgrund des erheblichen analytischen Aufwands (auch in der Probenaufarbeitung) nicht in der Lage waren, Kontrollen durchzuführen, die Möglichkeit, die notwendigen Proben zu überprüfen.

Für den Verbraucher bedeutet dies nicht nur eine verbesserte Lebensmittelqualität (mehr Kontrollen bieten mehr Sicherheit vor belasteten Lebensmitteln), sondern langfristig auch eine geringere Preissteigerung, da die Hersteller durch weniger Analysenkosten ihre Produkte evtl. preisgünstiger anbieten können.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht es, Testpackungen mit langfristig reproduzierbarer Qualität und ausreichender Haltbarkeit herzustellen, so daß auch der Vertrieb in andere Länder ohne weiteres zu gewährleisten ist.

Patentansprüche

1. Verfahren zur quantitativen enzymimmunologischen Bestimmung von niedermolekularen organischen Substanzen mittels der ELISA-Methode, dadurch gekennzeichnet, daß als Reaktionspartner ein enzymgekoppelter Antikörper verwendet wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Markierungsenzym alkalische Phosphatase verwendet wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Kopplungsreagenz zwischen Antikörper und Enzym Glutardialdehyd verwendet wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß der enzymgekoppelte Antikörper ein Antikörper gegen Ochratoxin A ist.
5. Verfahren nach Anspruch 1, 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß der enzymgekoppelte Antikörper ein Antikörper gegen Aflatoxin M1 ist.
6. Verfahren nach Anspruch 1, 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß der enzymgekoppelte Antikörper ein Antikörper gegen Aflatoxin B1 ist.
7. Verfahren nach Anspruch 1, 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß der enzymgekoppelte Antikörper ein Antikörper gegen Chloramphenicol ist.
8. Verfahren nach Anspruch 1, 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß der enzymgekoppelte Antikörper ein Antikörper gegen Zearalenon ist.
9. Verfahren nach Anspruch 1, 2 und 3, dadurch

gekennzeichnet, daß der enzymgekoppelte Antikörper ein Antikörper gegen Triazine ist.

10. Verfahren nach Anspruch 1, 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß der enzymgekoppelte Antikörper ein Antikörper gegen Deoxynivalenol ist. 5

11. Verfahren nach Anspruch 1, 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß der enzymgekoppelte Antikörper ein Antikörper gegen Dinitroaromaten ist.

12. Verfahren nach Anspruch 1, 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß der enzymgekoppelte Antikörper ein Antikörper gegen Ergot-alkaloide ist. 10

13. Verfahren nach Anspruch 1, 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß der enzymgekoppelte Antikörper ein Antikörper gegen Nitrosamine ist.

14. Verfahren nach Anspruch 1, 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß der enzymgekoppelte Antikörper ein Antikörper gegen Penicilline ist. 15

15. Verfahren nach Anspruch 1, 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß der enzymgekoppelte Antikörper ein Antikörper gegen Patulin ist. 20

16. Verfahren nach Anspruch 1, 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß der enzymgekoppelte Antikörper ein Antikörper gegen Phenylharnstoffe ist.

17. Verfahren nach Anspruch 1, 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß der enzymgekoppelte Antikörper ein Antikörper gegen chlorierte Aniline ist. 25

18. Verfahren nach Anspruch 1, 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß der enzymgekoppelte Antikörper ein Antikörper gegen chlorierte Phenole ist.

19. Verfahren nach Anspruch 1-18, dadurch gekennzeichnet, daß zum Ausgleich der Matrixeffekte bei der Testdurchführung die Standards in einem der Probe entsprechenden Null-Extrakt (toxinfrei, pestizidfrei, Arzneimittelfrei) angesetzt werden. 30

Hierzu 13 Seite(n) Zeichnungen 35

40

45

50

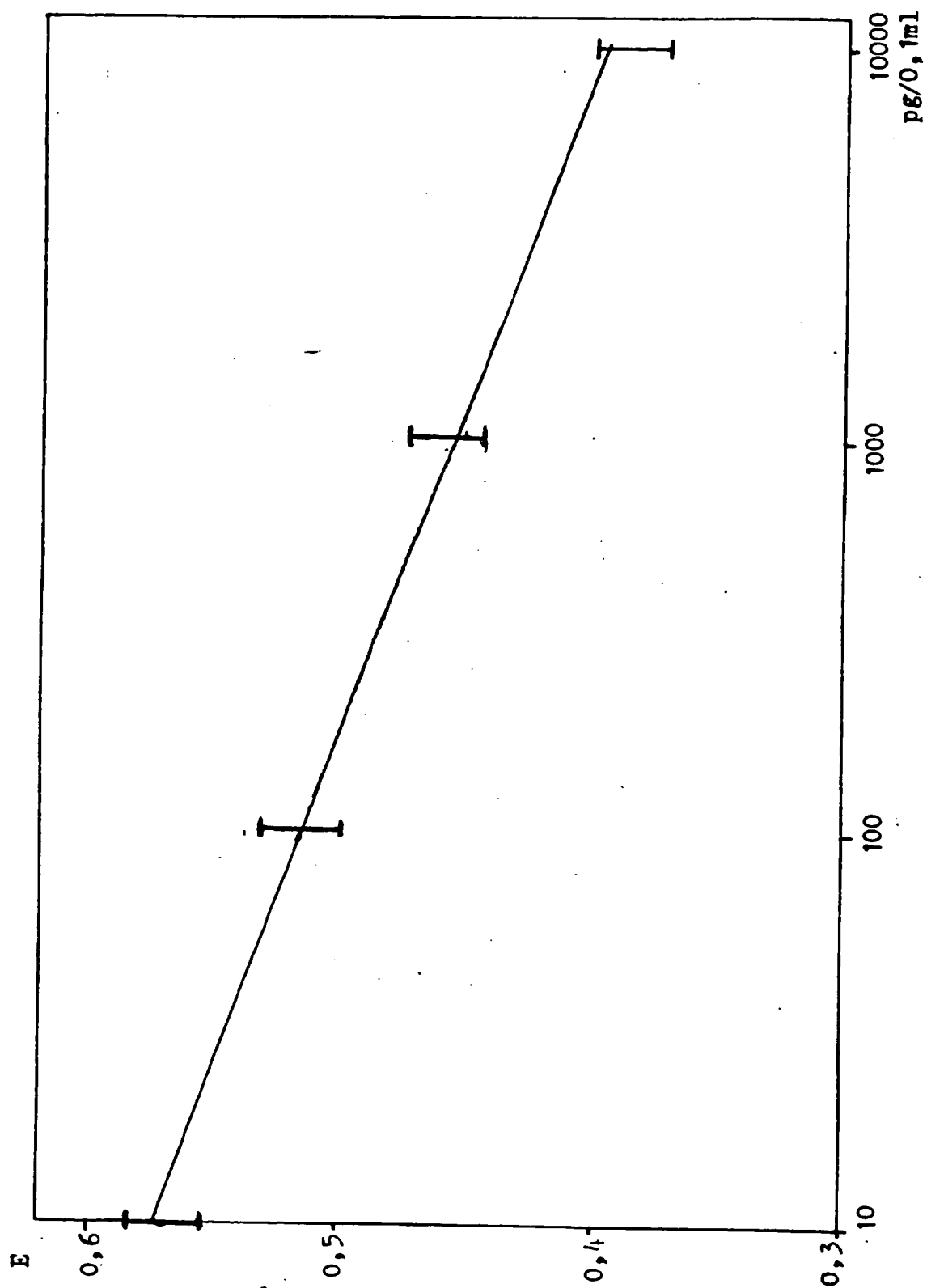
55

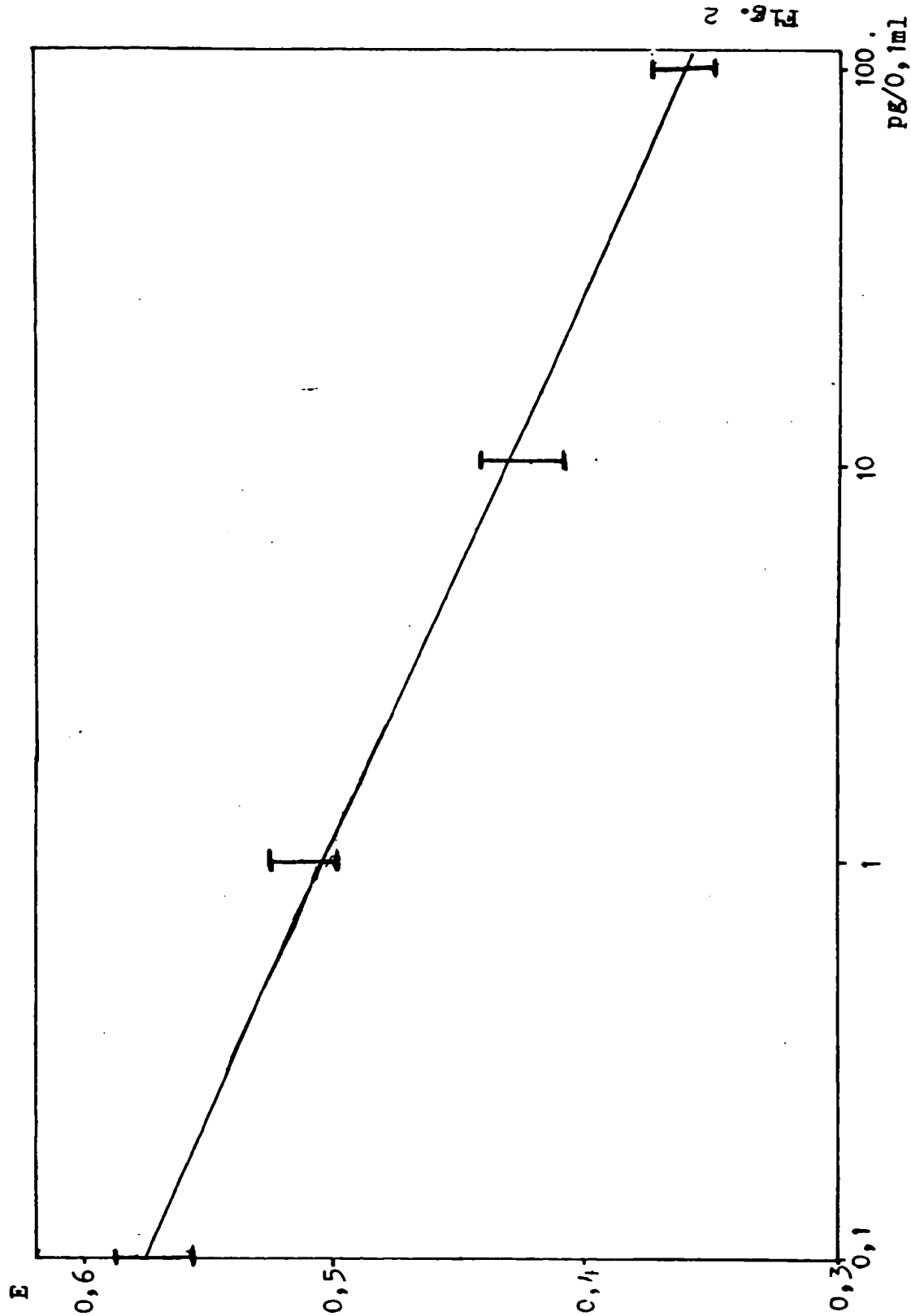
60

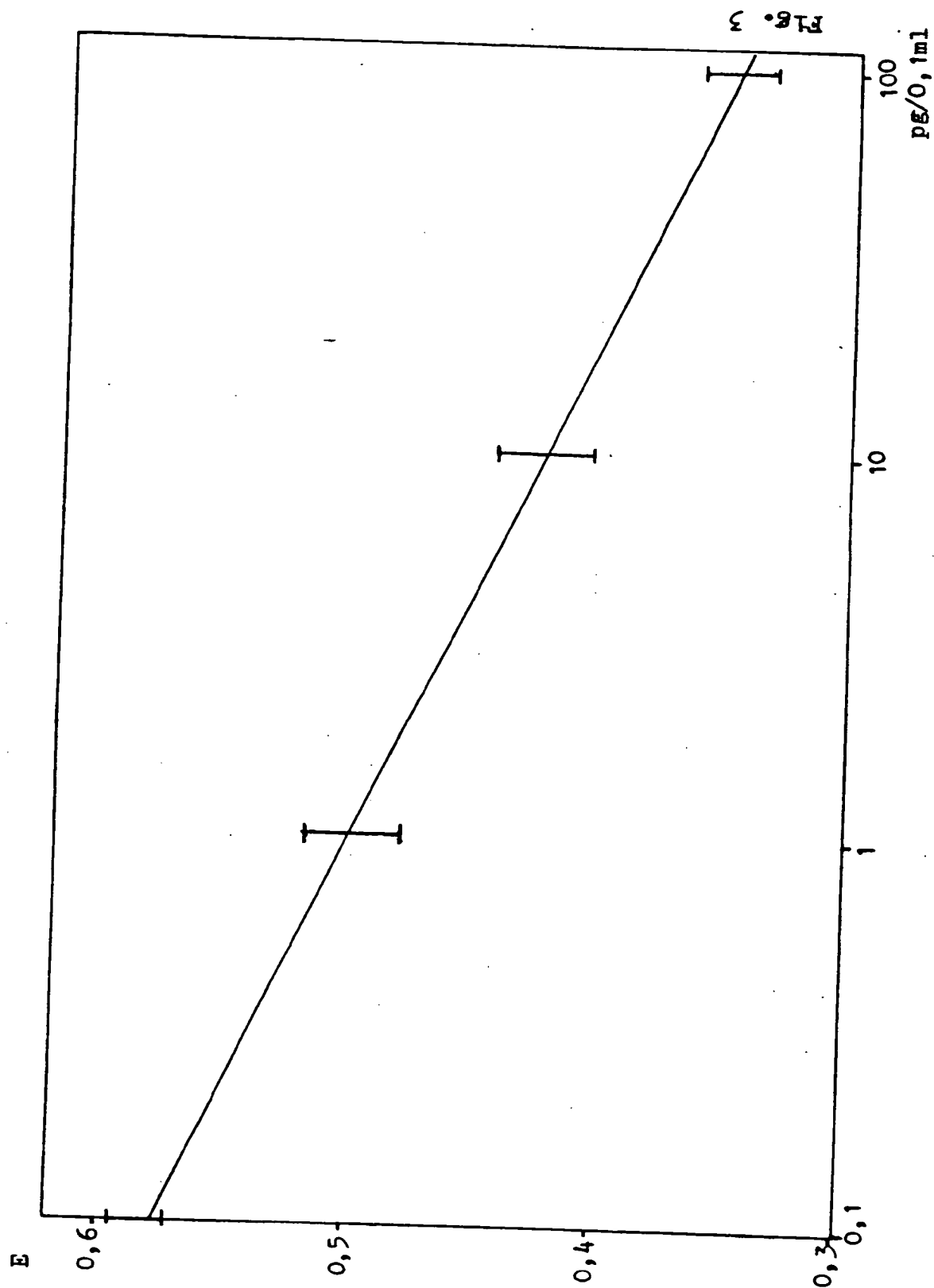
65

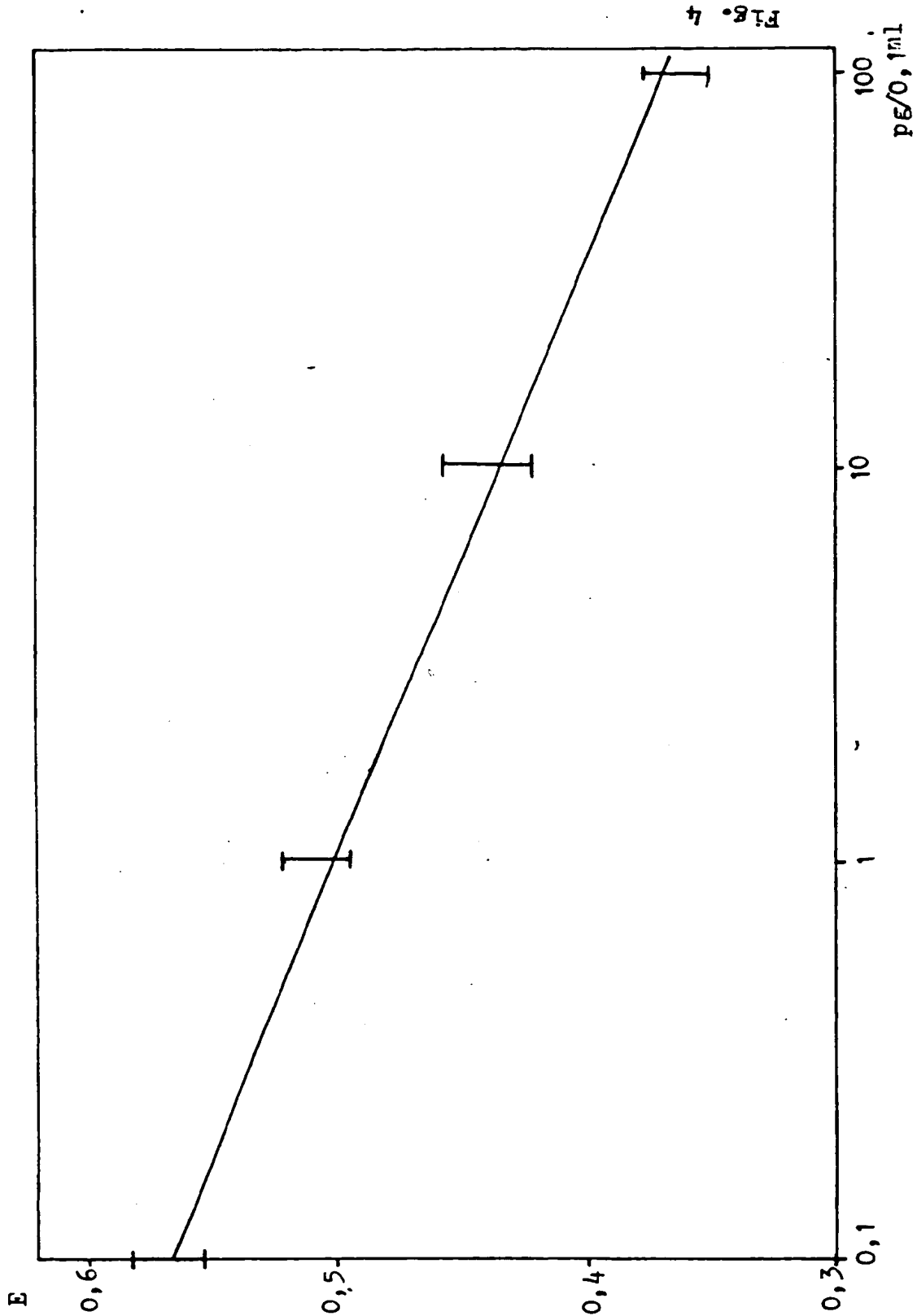
— Leerseite —

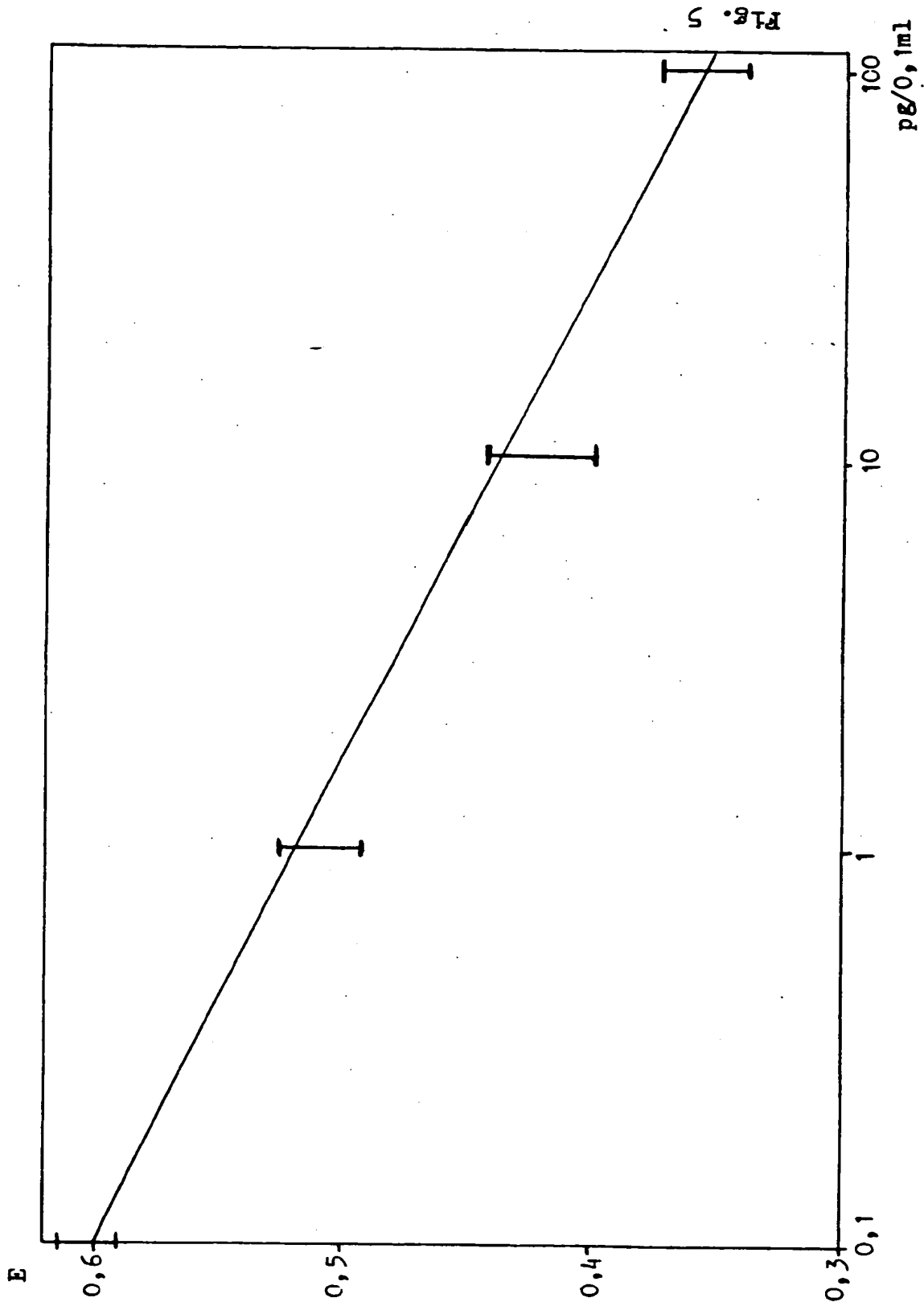
Fig. 1

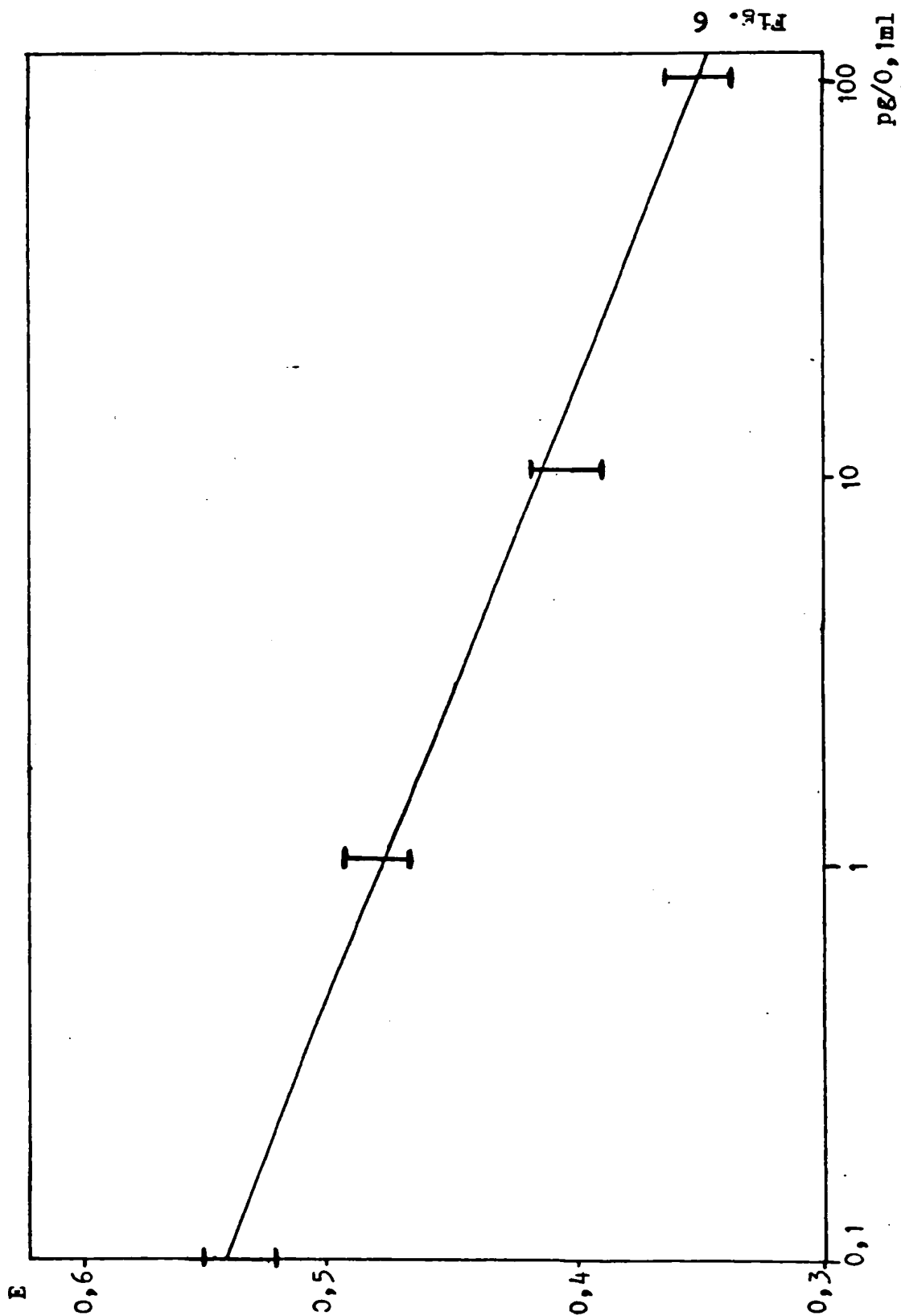


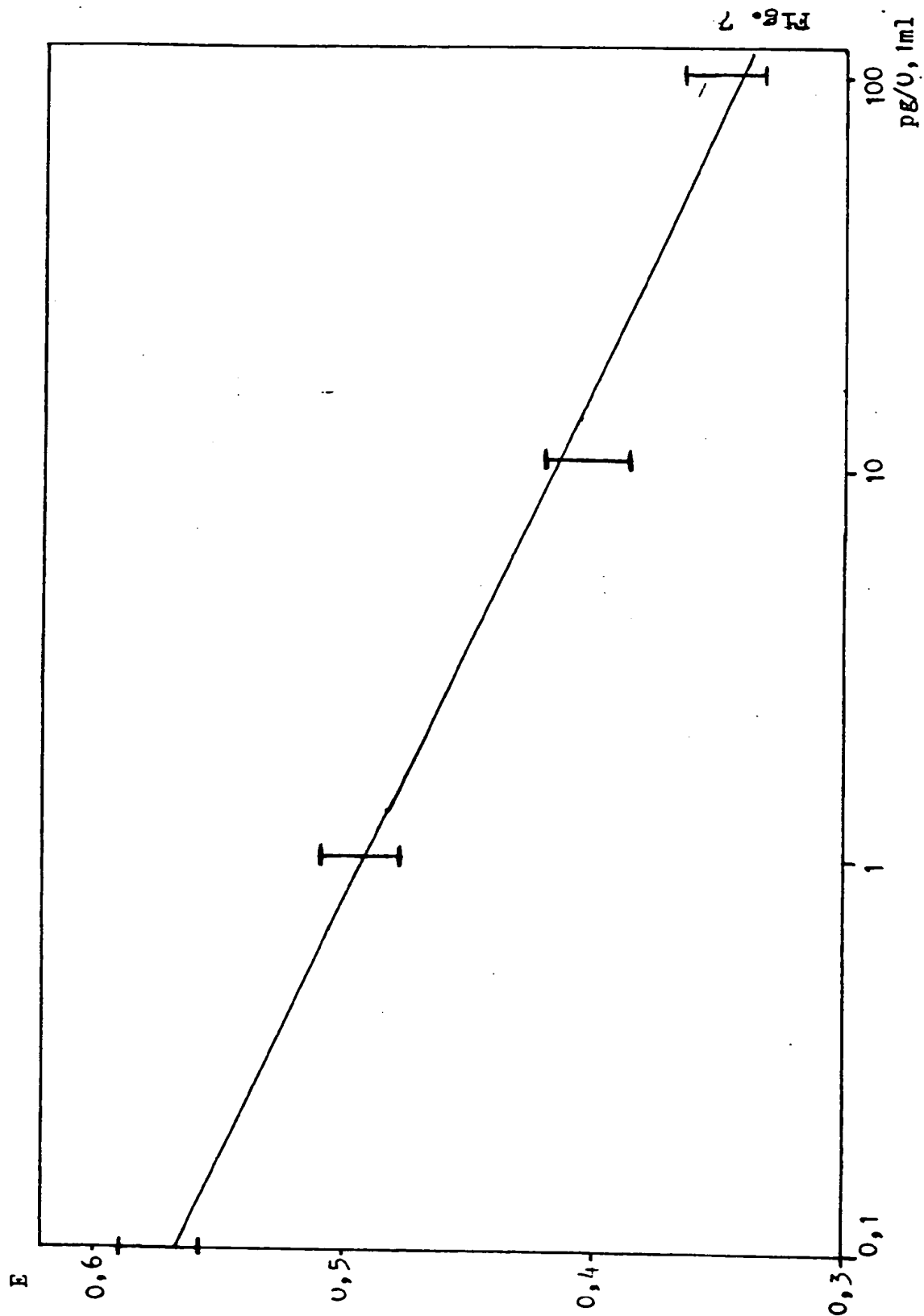


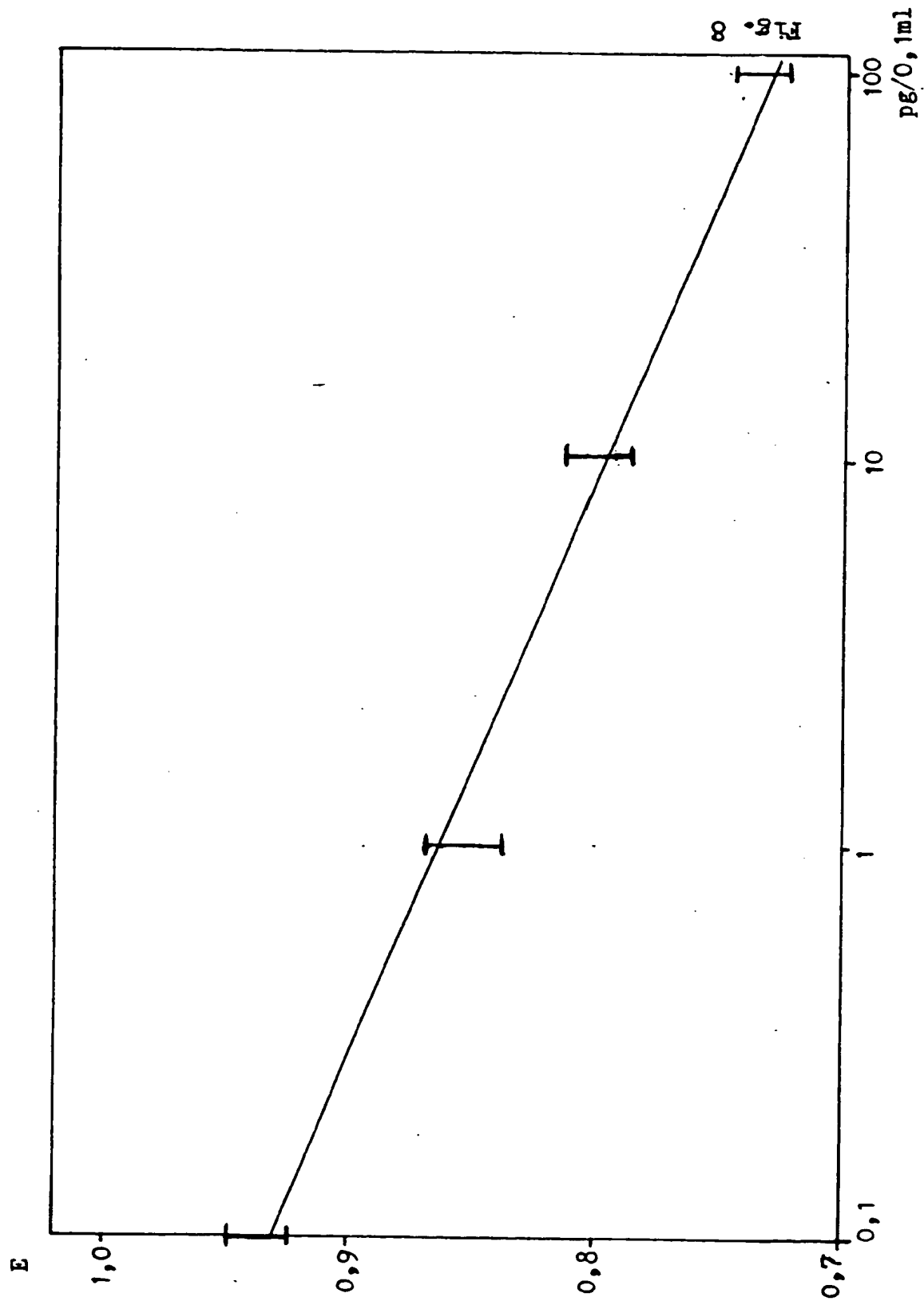


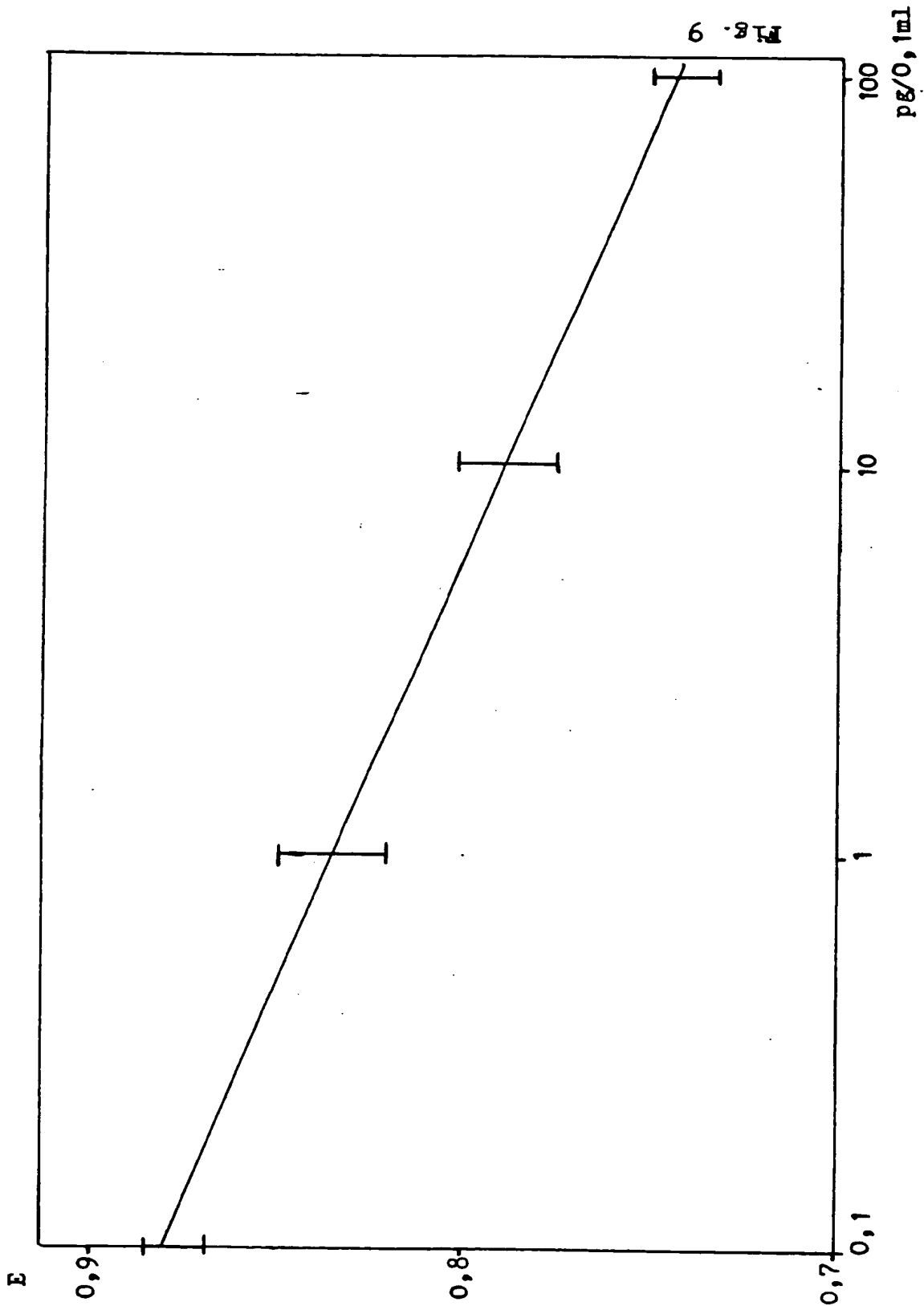


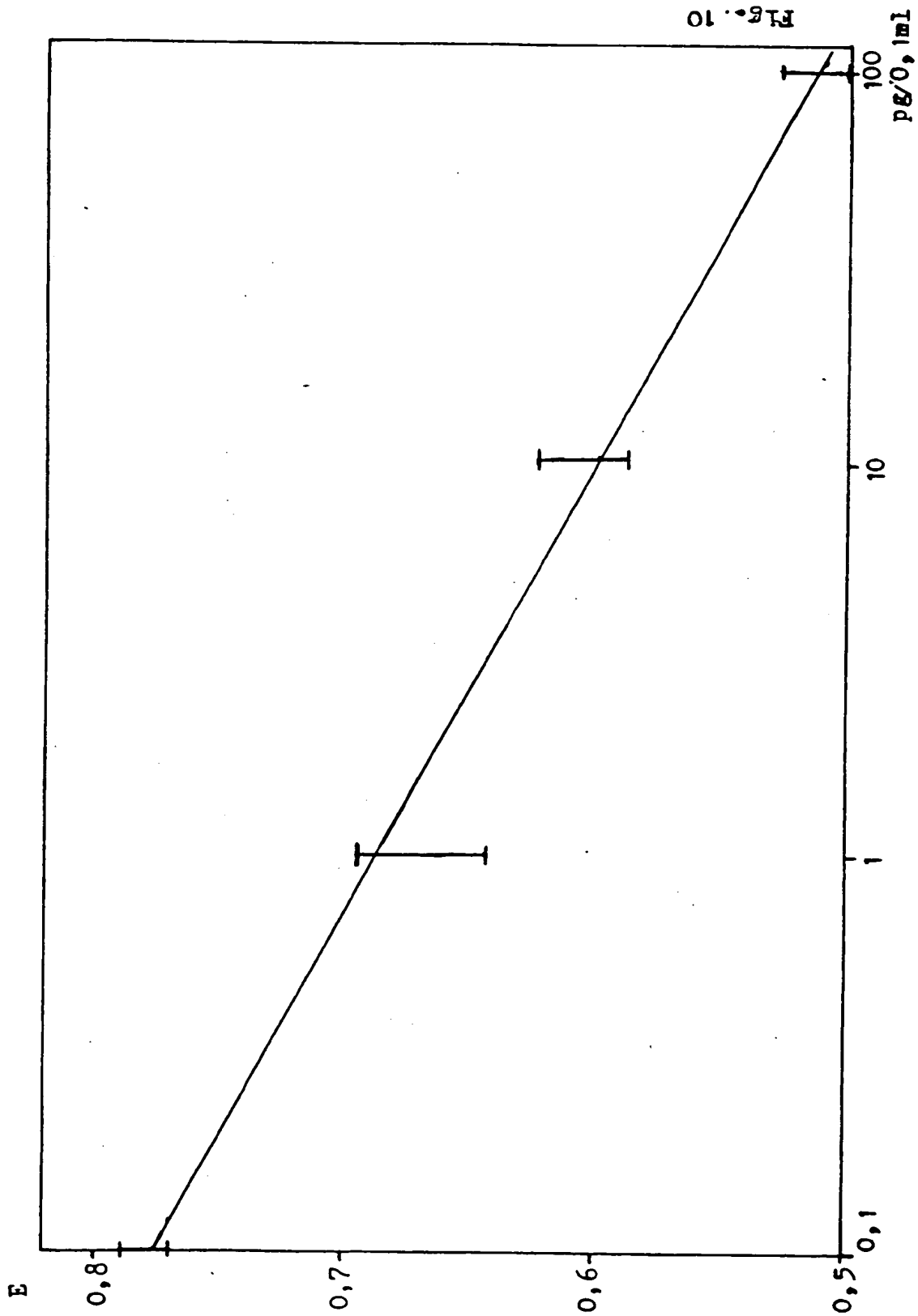


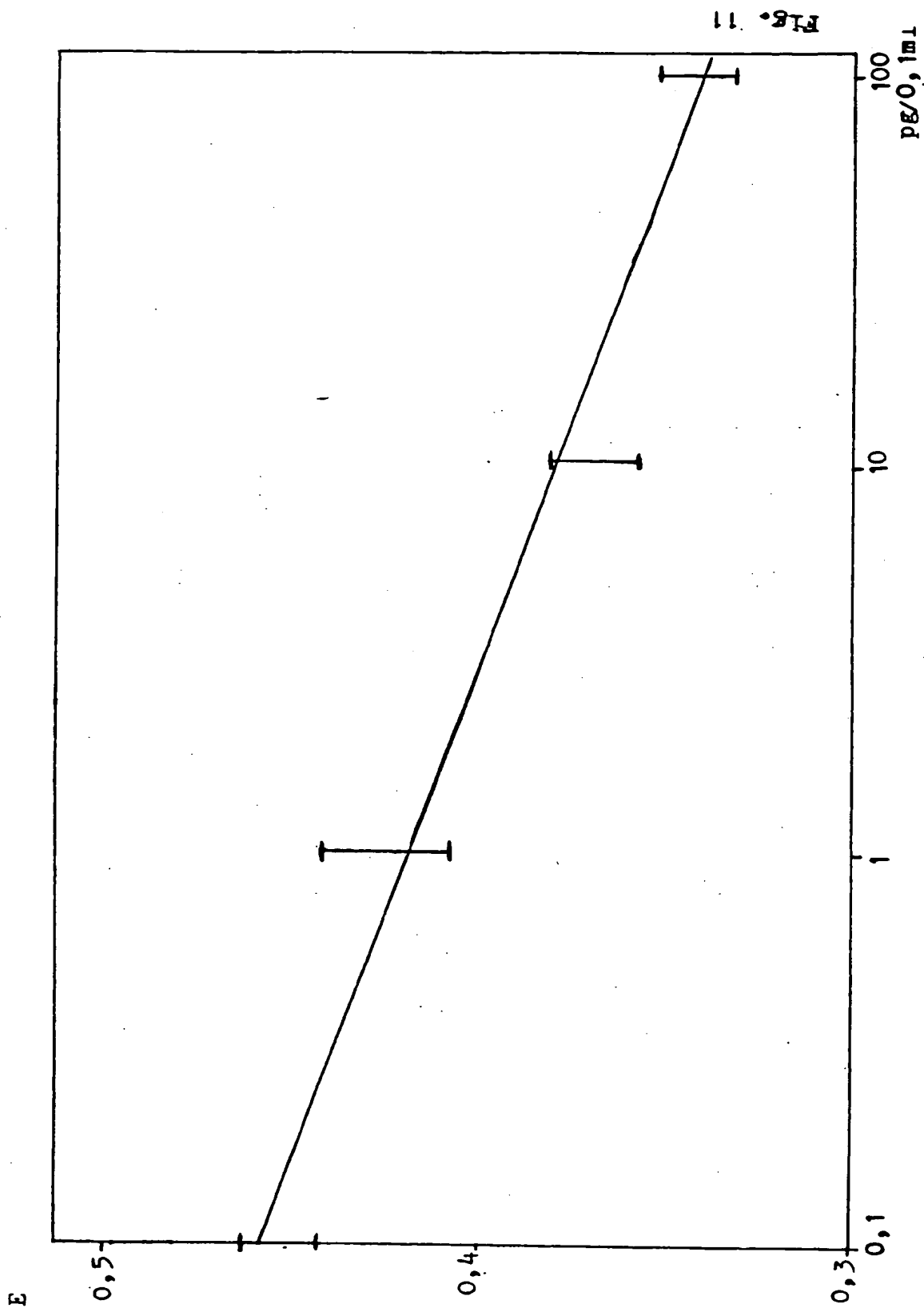












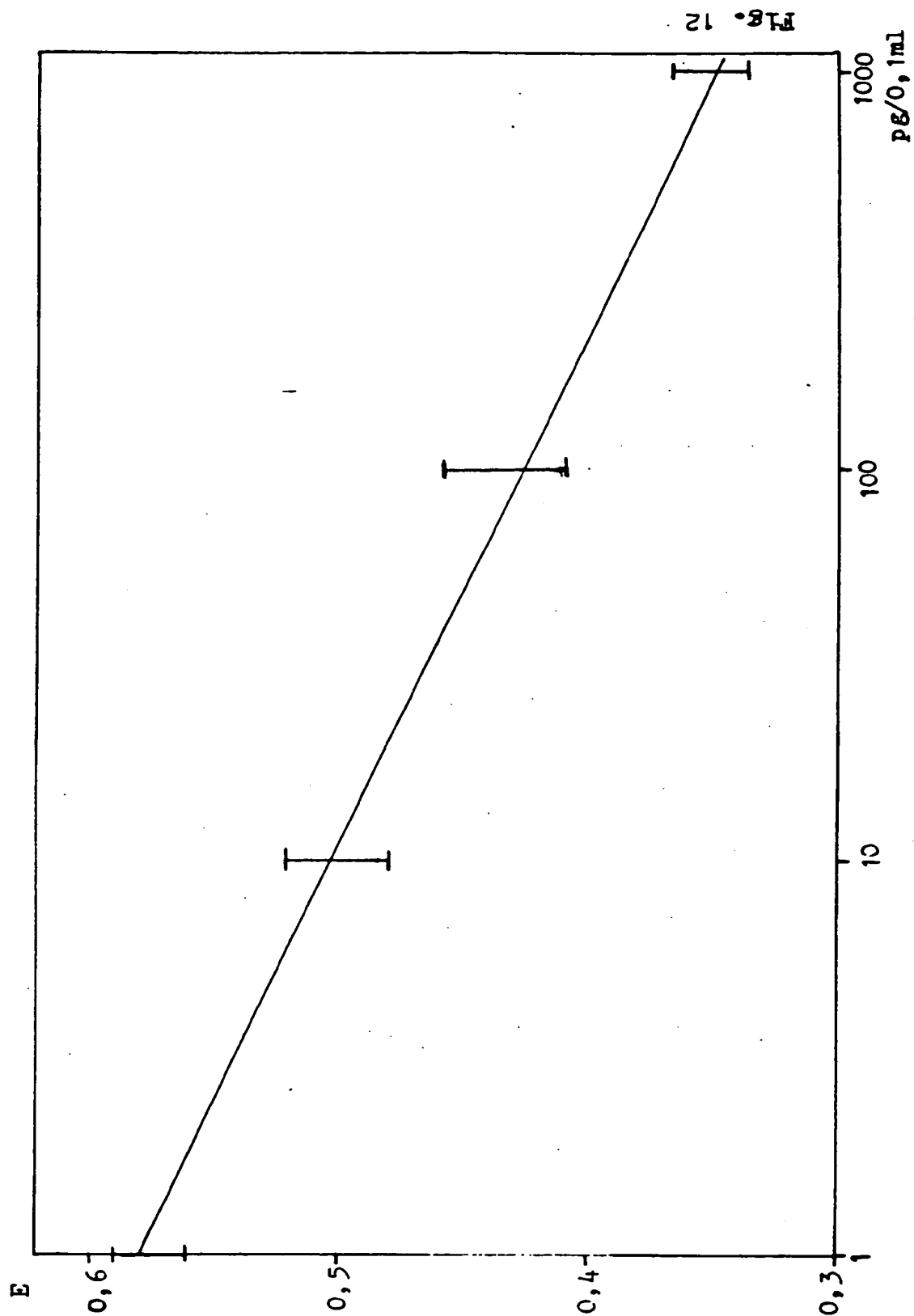


Fig. 13
--- Test von Pfeiffer.
— ordnungsgemäßes Verfahren

